

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

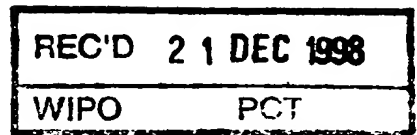
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FR 98/02605



BREVET D'INVENTION

09/555780

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 NOV. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

03 DEC 1997

97 15246 -

03 DEC. 1997

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE



n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
FR 59652 I 0153204848

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Micelles mixtes de lipopeptides pour l'induction d'une réponse immunitaire
et leurs utilisations à des fins thérapeutiques.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

1/ INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE (INSERM)

2/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

3/ INSTITUT PASTEUR DE LILLE

Forme juridique

Nationalité (s)

française

Adresse (s) complète (s)

Pays

FRANCE

1/ 101, rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13

2/ 3, rue Michel-Ange - 75794 PARIS CEDEX 16

3/ 1, rue du Professeur Calmette B.P. 245 - 59019 LILLE CEDEX

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

MICHELET Alain

C.P.I. bm (92-1176 i)

Cabinet HARLE ET PHELIP

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N/REF : FR 59 652 I

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 15246

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

TITRE DE L'INVENTION :

Micelles mixtes de lipopeptides pour l'induction d'une réponse immunitaire et leurs utilisations à des fins thérapeutiques

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

1/ INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM)

2/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

3/ INSTITUT PASTEUR DE LILLE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

GRAS-MASSE Hélène - 321, rue de la Rosière, 59710 Merignies

BOSSUS Marc - 8, rue Deschodt, 59 000 Lille

LIPPENS Guy - 48, rue de l'Amitié, 59211 Santes

WIERUSZESKI Jean-Michel - 16, rue des Fusillés, 62221 Noyelles
sous Lens

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS,
LE 23 DECEMBRE 1997



PHELIP Bruno
C.P.I. b m(92-1194 i)
Cabinet Harlé & Phélip

La présente demande a pour objet des micelles mixtes de lipopeptides pour l'induction d'une réponse immunitaire.

Elle a en outre pour objet l'utilisation de ces micelles à des fins thérapeutiques.

5 Il existe deux types de réponse immunitaire effectrice: la réponse humorale due aux anticorps, et la réponse cytotoxique due aux lymphocytes T CD8⁺.

Une réponse cytotoxique efficace requiert la présentation des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL), en association avec
10 les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC), mais aussi aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (HTL) en association avec les molécules de classe II du MHC.

L'utilisation de lipopeptides pour l'induction d'une réponse cytotoxique, c'est-à-dire la génération in vivo de lymphocytes T cytotoxiques a déjà été
15 décrite. En particulier, la demande FR-90 15 870 publiée sous le n°2 670 787 (Institut Pasteur de Lille, Institut Pasteur, INSERM) décrit des lipopeptides constitués d'une partie peptidique comprenant de 10 à 40 acides aminés et d'une partie lipidique qui peut être dérivée d'acides gras ou de groupements stéroïdes.

20 Ces lipopeptides montrent une bonne aptitude à induire une réponse cytotoxique. Il convenait cependant de les rendre capables d'induire une réponse de meilleure qualité par l'adjonction d'une réponse T auxiliaire dont on sait l'importance pour l'induction efficace et le maintien de la réponse cytotoxique. Il convenait en outre de les rendre capable d'induire
25 une réponse chez le plus grand nombre d'individus.

BOURGAULT et al. (1994, J. Immunol., 2530-2537) ont induit une réponse CTL et HTL à partir de mélange de lipopeptides, sous la forme d'une émulsion avec un adjuvant huileux.

Néanmoins, il était nécessaire d'ajouter de l'adjuvant incomplet de
30 Freund (IFA). L'immunogénicité de la préparation vaccinale utilisée impliquait

nécessairement la co-présentation fonctionnelle des motifs HTL et CTL situés dans un ou plusieurs lipopeptides du mélange. Cependant, l'efficacité de la co-présentation des différents motifs impliqués dépendait de l'association avec l'adjuvant Incomplet de Freund au sein d'une émulsion
5 très fine.

Un article au nom de **VITIELLO et al.** (1995, J. Clin. Invest., 95, 341-349) évoque la possibilité d'induire une réponse CTL dans une population humaine sélectionnée (HLA-A2) en utilisant un lipopeptide comportant une association séquentielle entre un épitope CTL HLA-A2 et un
10 épitope auxiliaire (HTL) multivalent. On notera que cette étude a été menée sur une population génétiquement restreinte.

Cet article rend compte également d'une expérience au cours de laquelle deux types d'associations entre épitope HTL et épitope CTL ont été comparées: d'une part une association covalente séquentielle au sein d'un
15 même lipopeptide, et d'autre part une association par simple mélange d'un lipopeptide comportant le motif CTL avec un peptide comportant le motif HTL. Les résultats de cette étude montrent un avantage très net de l'association covalente par rapport au mélange, tel qu'il a été réalisé par ces auteurs, c'est-à-dire par mélange de solutions comportant du DMSO et du
20 tampon PBS (les peptides ou lipopeptides sont maintenus en solutions stock à une concentration de 10 - 20 mg/ml et dilués extemporanément avec du PBS avant usage).

Cependant, la combinaison sur une même molécule lipopeptidique des épitopes cytotoxique et auxiliaire, bien que pouvant induire une réponse
25 immunitaire efficace, nécessite la synthèse de séquences d'acides aminés longues présentant de multiples épitopes susceptibles de s'associer à plusieurs HLA ou superfamilles d'HLA de classe I et de classe II. L'association covalente de tous ces motifs au sein d'une unique molécule représente des difficultés techniques difficilement surmontables, tant du

point de vue des méthodes de synthèse que des méthodes de caractérisation analytique.

En tout état de cause , cet article mentionne l'association d'un lipopeptide et d'un peptide, et non de deux lipopeptides. De ce fait aucune
5 formation de micelles mixtes ne peut avoir lieu.

Un autre article, publié par **DON DIAMOND et al** (1997, Blood, 90, n°5), mentionne l'immunogénicité d'un mélange entre un peptide portant un épitope CTL minimal (pp65, séquence 495-503 de la protéine de matrice du cytomégalo virus) et un peptide dipalmitoylé contenant un épitope HTL. Le
10 mélange est réalisé par mélange des solutions dans l'acide acétique dilué ou dans le DMSO, en utilisant un traitement par les ultrasons pendant 15 à 30 secondes.

Cet article ne décrit donc pas de mélange de lipopeptides contenant indépendamment un épitope CTL et un épitope HTL, mais le
15 mélange d'un lipopeptide contenant un épitope HTL et d'un nonapeptide correspondant à un épitope CTL minimal. D'ailleurs il n'est pas mentionné de formation de micelles mixtes ou de micro-agrégats. Dans ce cas particulier cependant, la possibilité d'association directe du nonapeptide avec les CMH de classe I exprimés à la surface des cellules peut expliquer le succès de
20 l'approche suivie. L'immunogénicité de la préparation signifie qu'il y a eu effectivement co-présentation des épitopes HTL et CTL par la même cellule présentatrice de l'antigène; cependant, le nonapeptide minimal utilisé présente la capacité à se lier directement avec les CMH de classe I à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène, sans que soit nécessaire
25 son apprêtement par la cellule.

Les auteurs concluent en reconnaissant que plusieurs obstacles existent encore pour obtenir une immunité à long terme, ce qui confirme le caractère expérimental de cette étude.

La difficile obtention d'une réponse immune dépendant d'un double apprêtement de peptides présentant séparément les épitopes HTL et CTL, est maintenant expliquée par une publication de STUHLER (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 622-627). Pour pouvoir observer l'induction d'une
5 réponse CTL, il est absolument nécessaire que les épitopes HTL et CTL soient présentés à la surface de la même cellule présentatrice de l'antigène (CPA) pour pouvoir être reconnu à la fois par les cellules T auxiliaire reconnaissant l'épitope HTL et les cellules T cytotoxiques reconnaissant l'épitope CTL.

10 Il ressort donc de ce qui précède que des compositions contenant au sein de mêmes micelles, ou de mêmes micro-agrégats, d'une part des lipopeptides présentant un épitope CTL et d'autre part des lipopeptides comprenant un épitope T auxiliaire, c'est-à-dire des micelles ou micro-agrégats mixtes, n'ont à la connaissance du demandeur, jamais été décrites.

15 Or, comme indiqué ci-dessus, il est absolument nécessaire que les deux épitopes, cytotoxique et T auxiliaire, soient présentés à la surface de la même cellule présentatrice de l'antigène.

Outre la nécessité d'une co-présentation des deux épitopes à la surface de la même cellule, il est aussi indispensable de solubiliser les
20 lipopeptides, afin de permettre leur administration aux patients, et leur stérilisation par filtration.

Le demandeur s'est donc attaché à trouver une solution à ces divers problèmes.

Il a montré que pour obtenir des micelles formées individuellement
25 de tous les peptides présents dans le mélange, qu'ils contiennent des épitopes HTL ou CTL, il était nécessaire d'associer les différents lipopeptides après les avoir au préalable dispersés au stade moléculaire dans un solvant adapté.

La présente invention a donc pour objet des micelles ou micro-agrégats pour l'induction d'une réponse immunitaire contenant au moins:

- un premier lipopeptide comprenant au moins un épitope CTL, ou épitope cytotoxique, et au moins un motif lipidique, et

5 - un second lipopeptide comprenant au moins un épitope auxiliaire et au moins un motif lipidique, dont la nature peut être différente du motif du premier lipopeptide.

Les micelles selon la présente invention ne sont néanmoins pas limitées à deux lipopeptides, mais peuvent comprendre d'autres lipopeptides
10 présentant indépendamment des épitopes HTL ou CTL.

On entend, pour la compréhension de la présente invention, par épitope T auxiliaire, une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe II, et capable d'être reconnu par les lymphocytes T auxiliaires.

15 On entend par épitope CTL une séquence d'acides aminés capable de s'associer à au moins un récepteur HLA de classe I et capable d'être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques.

Les épitopes T auxiliaires capables de s'associer à plusieurs récepteurs HLA de classe II différents sont appelés épitopes auxiliaires
20 multivalents (HTL multivalents).

En outre, on entend par micelles ou par micro-agrégats des agrégats de lipopeptides présentant une taille les rendant assimilables simultanément par toute cellule présentatrice de l'antigène (CPA) et préférentiellement d'une taille inférieure à environ 1µm.

25 Les micelles mixtes selon la présente invention, c'est-à-dire comprenant des lipopeptides comportant des épitopes cytotoxiques et des lipopeptides comportant des épitopes T auxiliaire, présentent l'avantage d'associer au sein du même microvolume assimilable par une seule CPA une grande diversité d'épitopes CTL et HTL, sans que soit nécessaire leur
30 association covalente, tout en respectant le critère de définition chimique

requis. Des micelles constituées chacune d'une seule variété de lipopeptide, contenant un épitope CTL ou un épitope HTL ne permettent pas d'obtenir une coprésentation efficace correspondant à l'induction d'une réponse effectrice forte.

5 En outre, l'obtention d'une réponse CTL grâce à l'emploi de micro-agrégats ou de micelles mixtes permet d'éviter l'utilisation d'émulsions avec des adjuvants huileux, tels que l'adjuvant incomplet de Freund, dont l'emploi n'est pas admis en thérapeutique humaine. Les micelles et micro-agrégats selon la présente invention sont cependant compatibles avec l'emploi
10 d'émulsions avec des excipients huileux cliniquement acceptables.

 Un autre avantage des micro-agrégats ou micelles mixtes selon la présente invention, comprenant individuellement au moins deux types de lipopeptides, réside dans le fait que la solubilisation de lipopeptides présentant une faible solubilité dans l'eau ou dans des solvants cliniquement
15 acceptables, ou de lipopeptides insolubles, peut être facilitée par leur combinaison avec d'autre(s) lipopeptide(s) présentant une meilleure solubilité.

 Les micelles selon la présente invention présentent encore l'avantage, par rapport aux lipopeptides dans lesquels les motifs HTL et CTL
20 sont associés de manière covalente et dont la taille est limitée, tels que décrits par VITIELLO et al. (1995, précédemment cité), de permettre l'association d'une grande diversité de motifs et donc de pouvoir être utilisés pour la vaccination de populations humaines ou animales non sélectionnées sur la base de la restriction génétique.

25 Les micelles selon la présente invention peuvent comprendre un lipopeptide présentant au moins un épitope CTL et un autre lipopeptide comprenant au moins un épitope auxiliaire. Néanmoins, de telles micelles peuvent aussi contenir plusieurs lipopeptides différents comprenant

différents épitopes cytotoxiques et différents lipopeptides présentant différents épitopes auxiliaires.

Les motifs lipidiques des lipopeptides peuvent être indépendamment un ou plusieurs motifs en C₄ à C₁₈, et en particulier une ou plusieurs chaînes
 5 dérivées d'acides gras, ou d'alcools gras, en C₄ à C₁₈, éventuellement ramifiés et insaturés ou être dérivés d'un stéroïde.

Ils peuvent comprendre une ou deux chaînes lipidiques en C₄ à C₁₈ associées par liaison covalente à un ou deux acides aminés de la partie peptidique. Ils peuvent ainsi être constitués de deux chaînes d'acide
 10 palmitique liées aux groupements NH₂, alpha et epsilon, d'une lysine.

Ces motifs lipidiques peuvent aussi être constitués de, ou comprendre un résidu d'acide palmitique, d'acide 2-amino-hexadécanoïque, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique, de pimélaute, de trimélaute, ou un dérivé du cholestérol, ou tout autre constituant lipidique
 15 naturel des membranes cellulaires.

De manière avantageuse, les lipopeptides constituant les micelles ou les micro-agrégats mixtes sont hydrosolubles dans une proportion d'au moins 30% (en poids). Ces lipopeptides hydrosolubles ont des propriétés de tensioactifs cationiques, propres à exercer un effet solubilisant vis-à-vis
 20 d'autres lipopeptides en milieu acide faible.

La partie non lipidique comprend quant à elle entre 10 et 100, et préférentiellement entre 10 et 50 acides aminés. Le nombre d'acides aminés dépend du nombre d'épitopes constituant la partie non lipidique du lipopeptide et de leurs tailles, de la nature de la partie lipidique, et des
 25 proportions des parties lipidiques et non lipidiques.

De manière avantageuse, les épitopes HTL et CTL employés sont des épitopes capables de s'associer à plusieurs HLA différents, ou épitopes multivalents (« promiscuous épitopes » en anglais).

L'épitope HTL employé est préférentiellement constitué par le peptide
 30 multivalent 830-843 de la toxine tétanique.

QYIKANSKFIGITE

La glutamine (Q) de cette séquenc peut éventuellement être acétylée.

D'autres épitopes HTL multivalents peuvent être l'épitope multivalent de l'hémagglutinine (**PREVOST-BLONDEL et al.** 1995, J. Virol., vol.62, n°12, pages 8046-8055) ou encore l'épitope PADRE (**ALEXANDER et al.**, 1994, Immunity, 1, 751).

L'épitope CTL peut quant à lui être tout épitope capable d'activer des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺.

Il est préférentiellement un épitope CTL d'une protéine présentée par une cellule tumorale et en particulier par un mélanome, d'une protéine du VIH, du virus de l'hépatite B (VHB) ou du papillomavirus, ou encore de la protéine p53.

Il peut être en particulier l'un des épitopes suivants:

- épitopes de la protéine BCR-ABL, résultant de la translocation BCR-Abelson (leucémie myéloïde chronique) tels que mentionnés dans le tableau 1.

- épitopes de la protéine p53, tels que ceux mentionnés dans le tableau 2.

Les épitopes de la protéine p53 peuvent en outre être pris dans les séquences 25-35, 63-73, 129-156, 149-156, 187-205, 187-234, 226-264, ou 249-264 de cette protéine.

- épitopes des protéines E₆ ou E₇ du papillomavirus humain (VPH), tels que ceux mentionnés dans le tableau 3.

- épitopes de protéines du virus VIH-1 tels que ceux mentionnés dans le tableau 4,

- épitopes du mélanome ou d'autres tumeurs, tels que ceux mentionnés dans les tableaux 5, 6 et 7 et en particulier épitopes de l'antigène melan-A/mart-1 du mélanome.

D'autres épitopes CTL plurivalents présentant une capacité d'association avec des HLA de classe I peuvent être ceux compris dans le peptide 43-57 de HPV (GQAEPDRAHNIVTF) qui contient des épitopes HLA A2, A24, B7 et B18.

Les épitopes CTL peuvent encore être ceux d'antigènes parasitaires, et en particulier de *Plasmodium falciparum*.

Les micro-agrégats ou micelles mixtes de lipopeptides selon la présente invention peuvent être lyophilisés, puis repris par tout tampon cliniquement acceptable pour être administrés aux patients à traiter, en particulier aux personnes à vacciner.

5 Ils peuvent être administrés par toute voie d'administration employée en thérapeutique et à titre non limitatif, par voie parentérale, percutanée, orale, sublinguale ou par nébulisat intra-pulmonaire.

Un autre objet de la présente invention est donc l'utilisation de ces lipopeptides pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour
10 l'induction d'une réponse immunitaire spécifique, et en particulier, pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre de cancers tels que le mélanome, des virus VIH et VHB, des papillomavirus, de la p53 ou de la malaria.

La présente demande a encore pour objet une composition
15 pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une quantité pharmacologiquement active d'un ou plusieurs des lipopeptides décrits ci-dessus, ainsi que des excipients pharmaceutiquement compatibles.

Les lipopeptides formant les micelles selon la présente invention peuvent être fabriqués par tout procédé adéquat connu de l'homme du
20 métier. Ils peuvent en particulier être obtenus par les méthodes Boc-benzyle ou Fmoc-tertiobutyle, en particulier comme décrits dans la demande FR-90 15 870, dont le contenu est intégré par référence à la présente demande .

L'introduction de la chaîne lipidique peut être réalisée en phase solide, après déprotection sélective de la ou les fonction(s) concernées,
25 comme décrit dans l'article de **DEPREZ et al.** (1996 , Vaccine, volume 14, n°5,375-382). La chaîne lipidique peut être introduite sur la fonction ϵ -NH₂ d'une lysine protégée sur la fonction α -NH₂ par un groupe F-moc. La Fmoc-

lys (Palm) obtenue peut être ensuite utilisée en synthèse en phase solide pour élaborer le lipopeptide.

Les micelles et micro-agrégats selon la présente invention peuvent être obtenus en dispersant chaque lipopeptide dans une solution d'acide acétique concentrée à environ 80% puis en mélangeant les solutions ainsi
5 obtenues.

La qualité de la dissolution, c'est à dire la dispersion effective à l'état moléculaire de chaque lipopeptide avant la préparation du mélange est vérifiée par la méthode de résonance magnétique nucléaire en deux
10 dimensions (RMN2D). La résolution du signal obtenu lors d'expériences en deux dimensions homonucléaires dans un champ de 600 Mhz confirme la dispersion complète, au stade moléculaire, des lipopeptides en solution. La limpidité du mélange n'est pas un critère suffisant : en particulier, la reprise des lipopeptides par du DMSO ou un mélange DMSO/eau ne permet pas,
15 dans la plupart des cas, d'obtenir cet état de dispersion, ce qui explique l'inefficacité du mélange étudié par VITIELLO ET al. (1995, précédemment cité). La dissolution par des mélanges acide acétique/eau plus dilués en acide acétique ne permet pas non plus de préparer dans tous les cas un mélange de micro-agrégats ou micelles mixtes comportant une proportion
20 statistique de chaque constituant du mélange au stade du microvolume. Dans ces deux cas, même en présence d'un mélange apparemment limpide, la filtration stérilisante sur membrane de 0,22 μm est soit impossible, soit irrégulière, avec des rendements de filtration différents selon les constituants, ce qui signifie qu'à l'échelle d'une particule de cette taille, la
25 représentation de chacun des constituants du mélange n'est pas obtenue. Cette microhétérogénéité compromet l'immunogénicité du mélange, puisqu'elle compromet la capture et la présentation simultanée de tous les constituants par une seule cellule présentatrice d'antigène (CPA), dans le cas d'épitopes CTL et HTL présents sur des lipopeptides distincts.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent.

La figure 1 représente la structure chimique de la résine de type KNORR-MBHA.

5 Les figures 2 et 3 représentent des spectres de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions (RMN 2D), respectivement d'un lipopeptide seul (lipopeptide ENV), et d'un mélange de lipopeptides.

La figure 4 illustre la réponse auxiliaire de huit macaques immunisés avec un mélange de lipopeptides.

10 Les figures 5A à 5F illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°109.

Les figures 6A à 6D illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°129.

15 Les figures 7A et 7B illustrent la réponse cytotoxique du macaque n°127.

Les figures 8, 9, 10 et 11 illustrent respectivement les réponses cytotoxiques des macaques N^{OS} 102, 105, 120 et 125.

EXEMPLE 1 : Préparation de micelles ou micro-agrégats selon l'invention:

20 **1 - description des lipopeptides employés dans le mélange**

nom	formules:	poids moléculaire
NEF 66	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLK(Pam)-NH ₂	

3862,77

25

NEF 117	TQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVP K(Pam)-NH ₂	
---------	---------------------------------------------------------	--

4017,754

NEF 182 EWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKN K(Pam)-NH₂ 3451,04
 GAG 183 DLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDR K(Pam)-NH₂ 3983,65
 5 GAG 253 NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH₂ 4063,05
 ENV TRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTGEIIGDIRQAH K(Pam)-NH₂ 4027,69

10 épitopes CTL représentés

RPNNNTRKSI	HLA-B27	TQGYFPDWQNY	HLA-B62
PPIPVGEIY	HLA-B35	YFPDWQNYT	HLA-B17, B35
KRWIILGLNK	HLA-B27	TPGPGVRYPL	HLA-B7
15 LGLNKIVRMY	HLA-B62	RYPLTFGW	HLA-B27.2
QVPLRPMTYK	HLA-A3, A11, B27.2	YPLTFGWC	HLA-B18
VPLRPMTY	HLA-B35	AFHHVAREL	HLA-B52
AVDLSHFL	HLA-B62	FLKEKGGL	HLA-B8
AVDLSHFLK	HLA-A11		

20 L'ensemble des épitopes représentés permettait d'espérer l'induction de réponses CTL chez une importante proportion de la population humaine, à condition de pouvoir bénéficier de l'effet auxiliaire des épitopes HTL non-définis, mais très probablement présents pour de simples raisons statistiques dans l'un quelconque des lipopeptides à condition toutefois de
 25 réunir tous les épitopes, et donc, tous les peptides constituant du mélange dans chaque micro-unité de volume.

2- Synthèse

L'approche phase solide a été choisie, en utilisant la stratégie Fmoc pour la protection de la fonction α-amine, et *t* Bu pour la protection des
 30 chaînes latérales. Le protocole utilisé est un protocole standard basé sur les

méthodes de synthèse décrites par **ATHERTON** (Solid-Phase synthesis, a practical approach. IRL press, 1989) et **FIELDS** et **NOBLE** (*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1990, 35, 161-214).

La Fmoc-Lys(Palm)-OH est couplée sur une résine de type
5 KNORR-MBHA (figure 1). Après déprotection de la fonction alpha-amine, on couple le premier acide aminé (Fmoc-Leu-OH dans le cas de NEF 66 par exemple). L'agent de couplage a été le TBTU (3 eq) en présence de DIPEA (4.5 eq), en vérifiant les couplages par un test colorimétrique. Une acétylation systématique a été réalisée après qu'une réaction négative ait
10 été obtenue à ce test, pour minimiser au maximum le risque d'obtenir des peptides à délétion. On répète cette succession d'opérations jusqu'à ce que tous les acides aminés constitutifs de la séquence aient été introduits.

Après la synthèse, et déprotection du groupe Fmoc terminal, les peptides sont déprotégés et clivés par un mélange TFA/eau/DTT (NEF 66,
15 ENV), TFA/eau/DTT/Ac-Trp-OH (GAG 183, GAG 253, NEF 117) ou TFA/eau/EDT/Ac-Trp-OH (NEF 182).

Les peptides sont purifiés chacun sur une colonne Vydac C18 qui a été exclusivement utilisée à cet effet, à température ambiante, avec un système solvant eau-acétonitrile, en tampon perchlorate ou TFA.

20 Ils sont ensuite mis sous forme d'acétate par échange d'ions sur colonne Dowex SBR, puis lyophilisés dans de l'acide acétique à 40 %.

Chaque peptide provient d'un lot unique de synthèse et purification. Aucune opération de recyclage de fractions de purification n'est pratiquée.

3 - Etudes de la solubilité des lipopeptides:

25 **3-1) Utilisation de l'eau pure:**

Les peptides NEF66, NEF117, NEF182 et ENV ont pu être dissous dans l'eau pure, à des concentrations allant jusque 5 mg/ml. Le peptide NEF117 donne cependant une solution très légèrement opalescente. Les peptides GAG 182 et GAG 253 ne sont pas solubles dans ces conditions.

- 5 Le mélange des lipopeptides est cependant soluble dans l'eau pure, indiquant un rôle potentiellement solubilisant des lipopeptides hydrophiles vis-à-vis des peptides peu solubles.

3-2) Utilisation du DMSO :

- 10 La mise en solution de lipopeptides est fréquemment réalisée à l'aide de solutions aqueuses de DMSO (diméthylsulfoxyde) . Ce solvant organique très puissant est en effet compatible après dilution avec la plupart des essais biologiques réalisés sur cellules ou chez l'animal, voire chez l'homme. L'utilisation de DMSO s'est avérée efficace pour une bonne reprise des peptides GAG 182 et GAG 253; les solutions obtenues ont ensuite pu
15 être diluées par de l'eau pour atteindre une concentration finale de 1 mg/ml dans le DMSO à 20% dans l'eau; dans ces conditions, la plupart des peptides donnent des solutions claires, sauf GAG 183, pour lequel on obtient une suspension.

- 20 Il est intéressant de souligner que même dans le cas de solutions claires, et malgré la compatibilité du DMSO avec les filtres Durapore, les solutions de lipopeptides dans le DMSO ne sont pas filtrables sur des filtres de porosité 0,22 μm , parce qu'elles imposent une pression incompatible avec la résistance mécanique des filtres. Cette observation indique la formation d'agrégats de taille supérieure à 0,22 μm . Dans certains cas, on
25 a même observé une impossibilité de filtration sur des filtres résistant aux solvants, d'une porosité de 1 μm , en raison de la formation de gels (cette

taille de filtre est en effet utilisée pour filtrer des solutions concentrées de lipopeptides avant purification par RP-HPLC).

3-3) Utilisation d'acide acétique concentré à 25%:

La mise en oeuvre de l'indispensable étape de filtration stérilisante
5 nécessite donc l'emploi d'un solvant organique plus apte à dissocier les
agrégats, compatible après dilution avec la lyophilisation, et non toxique à
faible dose . L'acide acétique a été testé.

Dans un premier temps, une quantité minimale de ce solvant, a été
mise en oeuvre qui est définie comme étant la quantité permettant
10 l'obtention de solutions limpides à des concentrations de 5 mg/ml : pour les
peptides GAG 183 et GAG 253, 25% d'acide acétique a été introduit; pour
les autres peptides, une mise en solution dans l'eau pure a été réalisée.

Les solutions ont été soumises à une analyse par Résonnance
Magnétique Nucléaire dans un champ de 600 Mhz. Il a été constaté que,
15 malgré l'apparente limpidité des solutions les lipopeptides de cette série,
même les lipopeptides les plus hydrophiles, forment des agrégats de taille
importante qui interdisent ce type d'étude, en l'absence de signaux résolus.

La mise en solution dans ces conditions ne permet pas la
dispersion statistique, au stade moléculaire, de chacun des constituants,
20 malgré l'apparente limpidité des solutions.

3-4) Utilisation d'acide acétique concentré à 80% :

L'utilisation d'acide acétique concentré à 80%, a alors été testée.
Les peptides ont été mis en solution à une concentration de 1mM dans 1 ml
d'acide acétique à 80% (correspondant à : NEF 66 : 3,86 mg/ml; NEF 117 :

4,02 mg/ml; NEF182 : 3,45 mg/ml; GAG 183 : 3,98 mg/ml; GAG 253 : 4,063 mg/ml; ENV : 4,027 mg/ml).

Analyse des lipopeptides par RMN du proton à 600 Mhz

Les échantillons de lipopeptides ont été préparés en dissolvant les
5 lipopeptides dans une solution d'acide acétique (CD₃COOD, 99,5% atom D. EURISO-TOP. France)/H₂O; 80:20 (V:V). 4 µl d'une solution 50 mM de TMSP [3-(triméthylsilyl)-propane sulfonate de sodium] dans D₂O sont ajoutés pour référencer les déplacements chimiques. La concentration finale de
10 chaque peptide est de 1mM dans au moins 2 ml de solvant, qui sont transférés dans des tubes R.M.N. de 8 mm de diamètre (WILMAD 513A-7PP, Interchim, France).

Les spectres de R.M.N. du proton ont été réalisés sur un spectromètre RMN BRUKER DMX600 équipé d'une sonde BBI 8 mm avec gradient z, à une température de l'échantillon à 310°K.

15 Les expériences en deux dimensions homonucléaires NOESY (Nuclear-Overhauser effect spectroscopy) selon Kumar et al. (1980, Biochem. Biophys. Res; Comm., 95, 1-6) et TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) selon Bax et Davis (1985 J. Magn. Reson., 65, 355-360) et Griesinger et al. (1988 J.A.C.S., 110, 7870-7872) ont été obtenues avec
20 2048 x 512 points complexes et traitées après multiplication dans les deux dimensions par un sinus déplacé de $\pi/4$ avec 2048 x 1024 points, ceci pour une fenêtre spectrale de 12 ppm. Les temps de mélange étaient de 300 ms pour la NOESY et 160 ms pour la TOCSY. Durant le temps de mélange du TOCSY, un MLEV 16 était appliqué avec un champs B1 de 7,8 Khz. Afin
25 d'être dans les mêmes conditions de température, le temps de « spin-lock » du TOCSY était appliqué hors résonance (+ ou - 1 Mhz) dans la NOESY. La

suppression de l'eau est achevée en utilisant une légère présaturation de ce signal pendant le temps de relaxation et le temps de mélange de la NOESY.

L'analyse par RMN à haut champ des solutions a montré des signaux parfaitement résolus, permettant des expériences TOCSY-NOESY, et l'attribution séquentielle complète de chaque lipopeptide. Ce résultat signifie la dispersion complète, à l'échelon moléculaire, des lipopeptides dans l'acide acétique à 80%.

Le spectre RMN 2D du peptide ENV est représenté sur la figure 2. Les spectres de tous les peptides ont pu être obtenus dans les mêmes conditions et interprétés. Afin de vérifier si le mélange des solutions entre-elles n'altérerait pas la dispersion des lipopeptides, un spectre RMN 2D du mélange virtuel, a été obtenu par superposition sur une même représentation des 6 spectres obtenus individuellement. Il a été comparé avec le spectre RMN 2D effectivement obtenu par mélange des solutions (figure 3). La résolution des signaux est restée comparable, attestant qu'aucun des peptides n'a altéré la solubilité des autres constituants du mélange.

L'analyse des séquences a nécessité une accumulation des signaux pendant 120 heures pour chaque lipopeptide, période au cours de laquelle aucune altération sensible des peptides n'a pu être détectée, ni par RMN, ni par RP-HPLC. Cette observation a donc permis d'envisager l'utilisation de ce solvant pour la solubilisation des lipopeptides, leur mélange, puis la filtration, même avec un temps de séjour de l'ordre de 1 ou 2 heures, éventuellement nécessaire à la manipulation de volumes relativement importants.

4 - Etudes de l'étape de filtration stérilisante:

4-1) Lipopeptides isolés:

Des essais de filtration stérilisante ont été réalisés à partir de solutions à 5 mg/ml de chaque lipopeptide dans l'eau pour les peptides NEF66, NEF117, NEF 182 et ENV et dans l'acide acétique à 25% pour les peptides GAG 183 et GAG 253. Les rendements de filtration de 1 ml sur
 5 filtres Millex GV SLGV 0130S (0,22 μ m) Millipore, suivie d'une lyophilisation figurent dans le tableau 8 (à la précision du dosage près) .

Ces résultats sont en accord avec les études de solutions réalisées par RMN, et donnent des indications sur la taille des agrégats ou micelles détectés: certains peptides forment des agrégats de taille supérieure à 0,22
 10 μ m, et conduisent par conséquent à des mélanges comportant des microhétérogénéités et une capture simultanée peu probable à l'échelle de la cellule présentatrice d'antigènes.

4-2) Préparation de divers mélanges de lipopeptides :

a) Préparation du lot CK2. Mélange simple des solutions, et 15 obtention d'un mélange limpide, mais microhétérogène:

Pour la mise en solution des lipopeptides et la préparation du mélange, des solutions d'aspect totalement limpide ont été mélangées entre elles, afin d'évaluer l'éventuelle contribution du caractère tensioactif des lipopeptides ENV, NEF 66, NEF117 et NEF182. Les conditions sont
 20 résumées dans le tableau 9

Les solutions obtenues ont été soumises à l'action d'ultrasons pour faciliter la dispersion des agrégats, mélangées pour donner un volume final de 5,5 ml. le mélange a été de nouveau soumis à l'action d'ultrasons, puis dilué par 9,5 ml d'eau pour obtenir une concentration finale d'environ 8 % en
 25 acide acétique (AcOH), compatible avec une lyophilisation de bonne qualité. Cette solution, après un dernier séjour dans le bain à ultrasons, a été filtrée sur filtres Millex GV SLGV 0130S (0,22 μ m) Millipore. Les rendements de

filtration des peptides en mélange ont été calculés pour chaque lipopeptide, pour donner les résultats représentés dans le tableau 9 en dernière colonne (à la précision du dosage près).

L'hétérogénéité des rendements selon les peptides atteste de l'hétérogénéité de la solution. Chaque peptide s'est comporté comme s'il était filtré individuellement : ce comportement est particulièrement évident avec le peptide GAG253, dont le rendement de filtration à partir de cette solution à 8 % d'acide acétique est inférieur au rendement de filtration observé lorsqu'il est filtré seul à partir d'une solution à 25% d'acide acétique. Ce résultat confirme que, en dépit de l'apparente limpidité du mélange en solution acétique diluée, le mélange entre les lipopeptides n'a pas fourni de micro-agrégats ou micelles mixtes, incorporant notamment les peptides les plus hydrophobes. Les échanges de lipopeptides entre micelles se font mal dans ces conditions, et la fonction tensioactive des lipopeptides ENV, NEF66, NEF 117 et NEF182 ne peut se manifester.

b) Préparation du lot CK3 : préparation de micelles ou de micro-agrégats mixtes ne comportant pas de microhétérogénéité

Pour garantir le mélange réel au niveau de chaque micro-unité de volume des différents lipopeptides, une stratégie différente a été suivie :

- chaque lipopeptide a été mis en solution dans l'acide acétique à 80% afin d'exploiter les propriétés dissociantes de ce solvant.
- afin d'exploiter les propriétés de tensioactif cationique attendues des peptides ENV, NEF66, NEF 117 et NEF182 en milieu acide faible lors de l'étape de dilution, les lipopeptides ont été dispersés en solution d'acide acétique à 80% selon la répartition suivante : 1 : ENV, 2 : NEF66, 3 : NEF 117, 4 : NEF182, en terminant par la dispersion des deux lipopeptides les plus hydrophobes dans une solution désormais concentrée en agents dissociants : acide acétique et détergents cationiques. Le cinquième

lipopeptide introduit a été GAG 183 et le sixième : GAG 253. Les ultrasons sont utilisés à chaque étape pour assurer une dispersion efficace des agrégats.

Les solutions sont mélangées, puis filtrées sur filtres Millex GV
 5 SLGV 0130S (0,22 μ m). La filtration nécessite une pression plus faible que
 lors de la filtration de la solution à 8%. Les récipients utilisés et le filtre sont
 ensuite rincés avec de l'eau, en quantité suffisante pour obtenir une
 concentration finale en acide acétique de 8 % (volume final 15 ml comme
 précédemment), afin d'assurer la qualité de l'étape de lyophilisation. Les
 10 rendements de filtration des peptides en mélange ont été calculés pour
 chaque lipopeptide, pour donner les résultats donnés dans le tableau 10 en
 dernière colonne (à la précision du dosage près).

L'homogénéité des rendements confirme l'homogénéité de la
 solution résultant de la dispersion à l'échelon moléculaire au moment de la
 15 filtration dans l'acide acétique concentré. La dilution ultérieure ne peut
 participer à un regroupement de chaque peptide en entités monovalentes,
 en application des lois de l'entropie. Cette méthode de préparation du
 mélange a donc permis l'obtention de micelles mixtes, comportant
 nécessairement chacune une représentation statistique de chaque
 20 lipopeptide. Les propriétés tensioactives des lipopeptides peuvent s'exercer
 et garantir la solubilité dans l'eau des doses de vaccins après lyophilisation
 ainsi que la stabilité des solutions pendant le temps des manipulations.

c) Préparation du Lot CK9

La procédure utilisée est la même que pour le lot précédent, aux
 25 quantités près. La solution de peptide (20 mg/ml dans l'acide acétique à 80
 %) a été filtrée en 4 fois, avec changement de filtre avant leur saturation, en
 utilisant des membranes identiques (unités stériles STERIVEX GV 0,22 μ m

Durapore (Millipore), puis complétée avec de l'eau utilisée pour rincer les filtres et diluer. Le volume final atteint était de 1516 ml (dont 154 ml d'acide acétique : solution finale à 10%). Le volume de répartition était de 1,3 ml par dose. Les doses réparties ont été lyophilisées, et dosées en utilisant une
5 méthode de dosage validée par HPLC. Le rendement de filtration pour chaque lipopeptide est indiqué ci-dessous dans le tableau 11, et prend en compte la sensibilité du dosage de chaque lipopeptide.

Lors de la préparation de ce lot, on observe encore une bonne homogénéité des rendements de filtration confirmant la formation de
10 micelles ou micro-agrégats mixtes, chaque micro-unité comprenant une proportion équivalente de chaque constituant du mélange.

Le mélange après dilution et lyophilisation fournit une poudre blanche formant un gâteau compact et homogène, très facilement remis en solution par de l'eau pure, ou un solvant capable de restaurer l'osmolarité de
15 la solution (glucose à 5%, mannitol à 5%). La solution présente une très légère opalescence. Le pH obtenu lors de la reprise par un solvant non tamponné est de 4,90. L'élévation du pH de 1 point provoque la formation lente d'un précipité: ce comportement contribue à la formation d'un dépôt lors de l'injection sous-cutanée ou intramusculaire.

20 **d) Essai d'uniformité de teneur sur le lot CK9**

Selon la Pharmacopée, les poudres pour usage parentéral sont soumises à l'obligation d'uniformité de teneur. L'essai doit être réalisé sur 10 unités prises au hasard, pour lesquelles on réalise individuellement un dosage du principe actif au moyen d'une méthode analytique appropriée. La
25 préparation satisfait à l'essai si la teneur de chaque unité est comprise entre 85 et 115 % de la teneur moyenne.

L'essai a été réalisé sur 15 échantillons pris au hasard, remis en solution et dilués dans de l'acide acétique à 80 % selon une procédure opératoire standardisée, de façon à injecter une proportion toujours identique d'environ 15 µg, définie lors de l'obtention de la droite étalon.

- 5 Chaque échantillon a été injecté trois fois, le dosage de chaque principe actif correspondant à la moyenne des trois valeurs obtenues.

Les valeurs obtenues figurent dans le tableau 12 ci-après. La répartition des valeurs est clairement statistique. On observe toutes les valeurs à l'intérieur d'un espace défini pour un test bilatéral avec un P =
 10 0,975 (sauf trois valeurs aberrantes, toutes retrouvées dans le flacon n°1, pouvant correspondre à une erreur de dilution). Les valeurs minimales et maximales définies se situent à l'intérieur des limites imposées par la Pharmacopée (l'écart observé se situe entre 4 et 14,95% selon les peptides, variation liée à l'imprécision inhérente au dosage).

- 15 L'absence de microhétérogénéité de la solution est confirmée par le fait que les doses de vaccins réparties ont satisfait à l'essai d'uniformité de teneur.

EXEMPLE 2- Préparation d'un mélange de lipopeptides (SIV-Mortara 1)

- 20 **et essai d'immunogénicité chez le macaque.**

1) Préparation du lot SIV-Mortara 1

Ce lot de petite taille a été préparé pour réaliser une étude pré-clinique chez le macaque, pour vérifier la tolérance et l'immunogénicité. Ce lot résulte du mélange des lipopeptides suivants:

nom formules:

NEF 101 SVRPKVPLRAMTYKLAIDMSHFIKEK K(Pam)-NH₂
 NEF 125 EKGGLEGIYYSARRHRILDMYLE K(Pam)-NH₂
 5 NEF 155 DWQDYTSGPGIRYPKTFGWLWKLK K(Pam)-NH₂
 NEF 201 SKWDDPWGEVLAWKFDPTLAYTYEA K(Pam)-NH₂
 NEF 221 YTYEAYARYPEELEASQACQRKRLEEG K(Pam)-NH₂
 GAG165 KFGAEVVPGFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDK(Pam)-NH₂
 GAG 246 QIQWMYRQQNPVGNIRRWIQLGLQKCVRMYNPTN
 10 K(Pam)-NH₂
 TT Ac- QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH₂

Leur mélange a été réalisé à partir des solutions dans l'acide acétique concentré, comme lors de la préparation du lot CK3.

15

2) Immunogénicité chez le macaque.

a) Matériels et méthodes

Les macaques, numérotés respectivement 102, 105, 109, 117, 120, 125, 127 et 129 ont été immunisés par injection sous-cutanée du lot préparé ci-dessus (500 µg), dans de l'eau stérile et ont été réinjectés dans
 20 un délai de trente jours et de soixante jours.

Ces immunisations ont été effectuées en accord avec les directives de l'Union Européenne.

Obtention de lignées CTL

25 Des cellules sanguines (PBMC) ont été isolées par centrifugation dans un gradient de densité à travers un milieu de séparation de lymphocytes (Pharmacia, Uppsala, Suède). Elles ont été utilisées immédiatement, ou stockées à -180°C dans de l'azote liquide. Des lignées CTL anti-peptide ont été obtenues en cultivant les PBMC des singes (2 x 10⁶
 30 cellules/ml) dans des plaques de microtitration , dans du RPMI 1640

complété avec de la pénicilline (100U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) de la L-glutamine (2 mM), des acides aminés non essentiels (1%), du pyruvate de sodium (1 mM), du tampon HEPES (10 mM), du 2-mercaptoéthanol (2×10^{-5} M) et du sérum de veau foetal inactivé par la
 5 chaleur (FCS) à 10%.

Le mélange des sept peptides libres, c'est-à-dire sans motif lipidique, (5 µm de chaque) correspondant aux séquences lipopeptidiques a été ajouté dans chaque puits.

Les plaques ont alors été incubées durant trois jours à 37°C et de
 10 l'Interleukine-2 a été ajouté dans chaque plaque (10 IU/ml).

Après sept jours et quatorze jours, les cellules effectrices ont été stimulées en ajoutant de nouveaux PBMC autologues, qui ont été mis en contact durant deux heures avec le mélange de peptide (5 µm de chaque), puis lavés et irradiés (4000 rads).

15 Mise en évidence de la prolifération des cellules T

Des cellules PBMC (2×10^5 dans 200 µl par puits) ont été cultivées dans des plaques contenant 1 µg/ml du lipopeptide TT (830-846), et 10µg/ml du peptide issu de la toxine tétanique (TT).

Après cinq jours de culture, 1 µCi de [3 H]TdR a été ajouté dans
 20 chaque puits et l'incubation a été poursuivie durant dix huit heures. Les cellules ont été alors récoltées à l'aide d'un récolteur automatique de cellules puis l'incorporation de la thymidine tritiée a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Analyse phénotypique des lignées cellulaires CTL

25 Le phénotype des lignées cellulaires a été déterminé le jour où le test de largage du chrome a été effectué, en incubant les cellules avec des anti-CD4 conjugués à du FITC (OKT4, Ortho Diagnostic Systems, Raritan,

NJ) et avec un anti-CD8 conjugué à de la phycoérythrine (Leu-2a, Becton Dickinson, Mountain View, CA) durant trente minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec du tampon PBS puis le pourcentage de cellules colorées a été déterminé à l'aide d'un cytomètre de flux Epics Elite (Coulter, Margency, France). Des anticorps présentant un mélange d'isotypes ont été utilisés comme témoins.

Transformation in vitro des lignées cellulaires B (B-LCL)

Les lignées cellulaires B (B-LCL) ont été obtenues en incubant des dilutions en séries de PBMC à l'aide du surnageant de la lignée cellulaire S 594. Cette lignée est infectée par le virus de l'herpès du babouin qui immortalise les cellules (herpès virus papio). Les B-LCL ont été ensuite cultivées dans du milieu de culture complété avec 10% de FCS.

Test de relargage du chrome.

Des cellules cibles ont été sensibilisées avec les peptides. 10^6 cellules B-LCL ont été incubées soit durant la nuit soit durant 1 heure, respectivement avec des peptides longs ou courts (gamme de concentration 10^{-5} M- 10^8 M) à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Afin d'obtenir les cellules cibles présentant les produits du gène SIVmac, les B-LCL ont été incubés à une concentration de 10^6 cellules/ml avec un virus de la vaccine recombinante (20 PFU/cellule) durant dix huit heures dans les mêmes conditions. Les BLCL ont été ensuite lavées et marquées avec 100µm Ci Na₂⁵¹CrO₄ (NEN Life Science Products, Courtaboeuf Les Ullis, France) durant 1 heure, lavées deux fois et utilisées comme cellules cibles. Le relargage du ⁵¹Cr a été effectué dans des plaques de microtitration. L'activité cytolytique des lignées cellules anti-SIV a été mesurée en mélangeant 5×10^3 cellules cibles marquées au chrome avec d s cellules

effectrices, dans des rapports cellules effectrices/cellules cibles divers, dans un volume final de 200 µl/puits. Les plaques ont été incubées durant 4 heures à 37°C, puis 100 µl de surnageant ont été pris dans chaque puits et analysés dans un compteur de rayonnement gamma.

5 Le relarguage spontané du chrome a été déterminé en incubant les cellules cibles avec du milieu seul. Il n'excède jamais 20% du chrome total incorporé.

Le relarguage spécifique du chrome a été mesuré de la manière suivante:

10 $100 \times (\text{cpm expérimentaux} - \text{cpm spontané}) / (\text{cpm maximum} - \text{cpm spontané})$.

La variation à l'intérieur d'un échantillon n'excède jamais plus de 5%.

b) Résultats

15 La figure 4 illustre la réponse T auxiliaire des huit macaques.

Les figures 5 à 11 illustrent la réponse cytotoxique des macaques.

Les résultats des immunisations avec divers peptides sont résumés dans le tableau 13.

20 Ils montrent que sept des huit macaques testés reconnaissent divers peptides, les macaques n°109, 129 et 127 montrant une réponse particulièrement importante.

25 L'efficacité de l'induction d'une réponse CTL confirme que les CPA des animaux ont pu capturer et présenter un ou plusieurs épitopes CTL, et simultanément l'épitope auxiliaire fort présent dans l'anatoxine tétanique et reconnu par certains des animaux .

EXEMPLE 3:**Préparation d'un mélange d lipopeptides (Lot HG 1) en vue d'un essai clinique chez l'homme .**

Un mélange de lipopeptides a été défini en vue de la réalisation
 5 d'un essai clinique (VAC10), associant au sein de micelles le même peptide
 TT à des séquences choisies sur le principe de sélection développé pour
 VAC04 (existence d'un ou plusieurs épitopes CTL par séquence).

- la cystéine du peptide NEF117 a été remplacée par une Leucine :
 après synthèse et essai sur test cellulaire de plusieurs analogues du
 10 nonapeptide épitope CTL renfermant cet acide aminé, il a en effet été
 observé que ce remplacement était possible; cette modification permet
 d'éviter les problèmes de stabilité dus à la formation de pont disulfure.

- le peptide GAG 17 a été choisi parmi d'autres candidats pour
 son caractère nettement tensioactif cationique susceptible d'aider au
 15 maintien en solution des autres peptides, et en particulier de GAG253,
 toujours présent dans le mélange, en raison de son immunogénicité chez
 l'homme.

La composition de ce mélange, dans laquelle Pam représente un
 motif dérivé de l'acide palmitique et Ac le groupe acétyl, est la suivante:

20 GAG 17 EKIRLRPGGKKKYKLKHIV K(Pam)-NH2
 GAG 253 NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH2
 POL 325 AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDL K(Pam)-NH2
 NEF 66 VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH2
 NEF 116 HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH2
 25 TT Ac-QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH2

L'ensemble de ces peptides a été synthétisé comme indiqué dans
 les exemples précédents. Le mélange des solutions a été réalisé sur un

échantillon de 5 mg de chaque peptide, dissous à une concentration de 20 mg/ml dans l'acide acétique à 80% puis mélangé dans l'ordre suivant : 1 : GAG17; 2 : NEF66; 3 : NEF 116; 4 : TT; 5 : GAG253 ; 6 : POL 325.

Les rendements de l'opération de filtration des solutions acide acétique concentrées, suivie d'une dilution par l'eau se sont avérés comparables aux rendements observés pour les mêmes opérations avec le mélange CK3 (à la précision du dosage près). L'homogénéité des solubilités et de comportements vis-à-vis de la filtration stérilisante en dépit des hétérogénéités de comportement chimique au stade individuel traduit la formation de micelles mixtes.

EXEMPLE 4:

Préparation d'un mélange de lipopeptides dérivés de l'antigène LSA3 en vue d'un essai pré-clinique de vaccination contre le stade intrahépatique de *Plasmodium falciparum*, réalisé chez la souris et le chimpanzé, puis d'un essai clinique chez l'homme.

LSAE CT1 LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH₂

LSA3 NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH₂

LSA3 NRII Ac-LEESQVNDDIFNSLVKSVQEQQHNVK(Pam)-NH₂

LSA3 RE K(Pam)VESVAPSVEESVAPSVEESVAENVEESVAENV-NH₂

L'ensemble de ces peptides a été synthétisé comme indiqué dans l'exemple 1. Le mélange des solutions a été réalisé sur un échantillon de 5 mg de chaque peptide préalablement dissous à une concentration de 20 mg/mL dans de l'acide acétique à 80% puis mélangés dans l'ordre suivant :

1 LSA3 NRI; 2:LSA3 NRII; 3:LSA3 CT1; 4: LSA3 RE. Les rendements de l'opération de filtration des solutions d'acide acétique concentrées, suivie d'une dilution par l'eau, se sont avérés comparables pour tous les lipopeptides.

TABLEAU 1 : Epitopes de BCR-ABL

Peptide	Séquence	Fixation au HLA
247-255	EDAEINPRF	B44
488-496	SELDLEKGL	B44
768-776	DELEAVPNI	B44
901-934 b2a2	KEDALQRPV	B44
902-935 b2a2	EDALQRPVA	B44
986-994	GEKLRVLGY	B44
1176-1184	EDTMEVEEF	B44
1252-1260	MEYLEKKNF	B44
1691-1699	NEEAADDEVF	B44
49-57	VNQERFRMI	B8
580-588	LFQKLASQL	B8
722-730	ARKLRHVFL	B8
786-794	ALKIKISQI	B8
886-893	CVKLQTVH	B8
928-936 b3a2	KALQRPVAS	B8
1830-1838	GAKTKATSL	B8
1975-1983	IQQMRNKFA	B8
1977-1984	QMRNKFAF	B8
252-260	NPRFLKDNL	B7
329-338	TPDCSSNENL	B7
693-701	TPRRQSMTV	B7
1058-1066	SPGQRSISL	B7
1196-1205	HPNLVQLLGV	B7
1560-1569	SPKPSNGAGV	B7
1717-1725	KPLRRQVTV	B7
1878-1884	SPAPVPSTL	B7
36-44	ERCKASIRR	B27
71-79	DRQRWGFRR	B27
575-583	QRVGDLFQK	B27
834-842	FRVHSRNGK	B27
642-650	LLYKPVDRV	A2
684-692	FLSSINEEI	A2
708-716	QLLKDSFMV	A2
714-722	FMVELVEGA	A2
817-825	KLSEQESLL	A2
881-889	MLTNSCVKL	A2
908-917	GLYGFLNVIV	A2
912-920	FLNVIVHSA	A2
1240-1248	VLLYMATQI	A2
1903-1911	FIPLISTRV	A2
1932-1940	VVLDSTEAL	A2
50-58	NQERFRMIY	A1
223-231	VGDA SRPPY	A1
549-558	KVPELYEIHK	A3/A11
583-591	KLASQLGVY	A3/A11
715-724	MVELVEGARK	A3/A11
916-923	IVHSATGFK	A3/A11
920-928 b3a2	ATGFKQSSK	A3/A11
924-932 b3a2	KQSSKALQR	A3/A11
1156-1165	EVYEGVWKKY	A3/A11
1311-1320	SLAYNKFSIK	A3/A11
1499-1509	NLFSALIKK	A3/A11
1724-1734	TVAPASGLPHK	A3/A11
1905-1914	LISTRVSLRK	A3/A11
1922-1930	RIASGAITK	A3/A11
924-936 b3a2	KQSSKALQRPVAS	DR4

TABLEAU 2 - Epitopes de la p53

	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A1:</u>
	RVEGNLARVEY (196-205)
5	GSDCTTIHY (226-234)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A2:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
	RMPEAAPRV
10	ALNKMFCQL (129-137)
	STPPPGTRV (149-157)
	GLAPPQHLIRV (187-197)
	LLGRNSFEV (264-272)
	PLDGEYFTL (322-330)
15	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-A3:</u>
	RVRAMAIYK (156-164)
	RRTEENLR (282-290)
	ELPPGSTKR (298-306)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B7:</u>
20	LPENNVLSPL (26-35)
	APRMPEAAPPV (63-73)
	APRMPEAAPRV
	APPQHLIRV (189-197)
	RPILTIITL (249-257)
25	KPLDGETYFTL (321-330)
	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B8:</u>
	CQLAKTCPV (135-143)
	GLAPPQHLL (187-195)
	NTFRHSVVV (210-218)
30	<u>- épitopes de la p53 se liant au HLA-B51:</u>
	LLPENNVLSPL (25-35)
	RMPEAAPPV (65-73)
	LIRVEGNLRV (194-203)

TABLEAU 3**Epitopes des protéines E₆ et E₇**

5	YMLDLQPETT (E7 11-20)
	LLMGTLGIV (E7 82-90)
	TLGIVCPI (E7 86-93)
	TIHDIILECV (E6 29-38)
	KLPQLCTEL (E6 18-26)
10	RPPKLPQL (E6 8-15)
	LRREVDFAFRDLCIVYRDGNPY (E6 45-67)
	ISEYRHYCY (E6 80-88)
	EKQRHLDKKQRFHNIRGRWT (E6 121-140)
	GQAEPDRAHYNIVTF (E7 43-57)
15	QAEPDRAHY (E7 44-52)
	EPDRAHYNIV (E7 46-55)

TABLEAU 4 : Épitopes du virus VIH-1

HLA-A1

(Nef 96-106: GLEGLIHSQRR
 (Nef 121-128: FPDWQNYT
 (Nef 137-145: LTFGWCYKL
 (Nef 184-191: RFDSRLAF
 (Nef 195-202: ARELHPEY :

HLA-A2

Gp120 121-129: KLTPLCVTL
 P17 77-85: SLYNTVATL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 275-285: VLDVGDAYFSV
 RT 346-354: KTYQYMDDL
 RT 368-376: KIEELRQHL
 RT 376-387: LLRWGLTTPDK
 RT 476-484: ILKEPVHGV
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 RT 683-692: ELVNQHEQL
 Nef 136-145: PLTFGWCFKL
 Nef 180-189: VLQWRFDSRL
 Nef 190-198: ALHHVAREL
 Gp41 818-826: SLLNATVDI
 P24 185-193: DLNTMLNTV
 RT 346-354: VIYQYMDDL
 RT 588-596: PLVKLWYQL
 Pro 143-152: VLVGPTPVNI
 (Gp120 37-44: TVYYGVPV
 (Gp120 115-122: SLKPCVKL
 (Gp120 313-321: RIQRGPGR
 (Gp120 197-205: TLTSCNTSV
 (Gp120 428-435: FINMWQEV
 (Gp41 836-844: VVQGAYRAI
 (p24 219-228: HAGPIAPGQM
 (p15 422-431: QMKDCTERQA
 (p15 448-456: FLQSRPETA
 (RT 681-691: ESELVNQIEG

HLA-A3

P17 18-26: KIRLRPGGK
 P17 20-28: RLRPGGKKK
 RT 200-210: ALVEICTEMEK
 RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 359-368: DLEIGQHRTK
 Nef 73-82: QVPLRPMYK
 Gp120 37-46: TVYYGVPVWK
 Gp41 775-785: RLRDLLLIVTR
 P17 18-26: KIRLRPGGK

HLA-A11

RT 325-333: AIFQSSMTK
 RT 507-517: QYQEPFKNLK
 Nef 73-82: QVPLRPMYK
 Nef 84-92: AVDLSHFLK
 p24 349-359: ACQVGGPGHK
 P17 83-91: ATLYCVHQR -

HLA-A24 (A9)

Gp120 52-61: LFCASDAKAY
Gp41 591-598: YLKDQQLL
ou 590-597: RYLKDQQLL
(RT 484-492: VYYDPSKDL
(RT 508-516: IYQEPFKNL
(RT 681-691: ESELVNQIEG

HLA-A25 (A10)

P24 203-212: ETINEEAAEW

HLA-A26 (A10)

P24 167-175: EVIPMFSAI

HLA-A30 (A19)

(Gp41 845-852: RAIRHIPRR

HLA-A31 (A19)

Gp41 775-785: RLRDLLLLIVTR

HLA-A32 (A19)

Gp120 424-432: RIKQIINMW
Gp41 774-785: HRLRDLLLI
RT 559-568: PIKETWETV

HLA-A33 (A19)

(P24 266-275: IILGLNKIVR

HLA-B7

RT 699-707: YLAWVPAHK
Nef 68-77: FPVTQVPLR
Nef 128-137: TPGPGVRYPL
Gp120 303-312: RPNNTTRKSI
Gp41 848-856: IPRRIRQGL
RT 699-707: YLAWVPAHK

HLA-B8

Gp120 2-10: RVKEKYQHL
P17 24-32: GGKKKYKLL
Nef 90-97: FLKEKGGL
P24 259-267: GEYKRWI
Gp41 591-598: YLKDQQLL
(Gp41 849-856: PRRIRQGL
ou 851-859: RIRQGLERIL
(P24 329-337: DCKTILKAL
(RT 185-193: GPKVKQWPL
(Nef 182-189: EWRFDSSL

HLA-B14

Gp41 589-597: ERYLKDQQL
P24 298-306: DRFYKTLRA
(P24 183-191 ? : DLNTMLNTV
(p24 304-313: LRAEQASVQEV
(p24 305-313: RAEQASVQEV

HLA-B18

Nef 135-143: YPLTFGWCY
Nef 135-143: YPLTFGWCE

HLA-B27

P24 263-272: KRWLGLNK
 Nef 73-82: QVPLRPMTYK
 Nef 134-141: RYPLTFGW
 ou 133-141: YPLTFGW
 Gp41 589-597: ERYLKDQQL
 (Gp41 791-800: GRRGWEALKY)

HLA-B35

Gp120 78-86: DPNPQEVVL
 Gp120 257-265: RPVVSTQLL
 RT 285-294: VPLDKDFRKY
 RT 323-331: SPAIFQSSM
 RT 342-350: NPDIVTYQY (consensus clade B)
 RT 460-468: IPLTEEAEL
 RT 598-608: EPIVGAETFY
 Nef 68-76: FPVRPQVPL
 Nef 74-81: VPLRPMTY
 Gp41 611-619: TAVPWNASW
 Gp120 42-52: VPVWKEATTTL
 P17 124-132: NSSQVSQNY (consensus clade B)
 P24 254-262: PPIPVGEIY (consensus clade B)

HLA-B37

Nef 120-128: YFPDWQNYT

HLA-B44 (B12)

P24 178-186: SEGATPQDL
 (p24 175-184: LESGATPQDL)

HLA-B51 (B5)

gp41 562-570: RAIEAQQHL
 RT 200-208: ALVEICTEM
 RT 209-217: EKEGKISKI
 RT 295-302: TAFTPSI

HLA-B52 (B5)

Nef 190-198: AFHHVAREL

HLA-B55 (B22)

Gp120 42-51: VPVWKEATTTL

HLA-B57 et B58 (B17)

P24 240-249: TSLTQEQIGW
 Nef 116-125: HTQGYFPDWQ
 ou 116-124: HTQGYFPDW
 Nef 120-128: YFPDWQN
 (P24 147-155: ISPRTLNAW
 (P24 164-172: FSPEVIPMF)

HLA-Bw62 (B15)

P17 20-29: RLRPGGKKKY
 P24 268-277: LGLNKIVRMY
 RT 427-438: LVGKLNWASQIY
 Nef 84-91: AVDLSHFL
 Nef 117-127: TQGYFPDWQNY

Tableau4(suite)HLA-Cw4

gp120 380-388: SFNCGGEFF

HLA-Cw8RT 663-672: VTDSQYALGI :
P24 305-313: RAEQASQEV
Nef 82-91: KAALDL^USHPLHLA-Cw?

P24 308-316: QATQEVKNW

TABLEAU 5 - Epitopes d Mélanome humain

Gene/protéine	MHC restriction	Peptide	Position des acides aminés
Tyrosinase	HLA-A2	MLLAVLYCL	1-9
	HLA-A2	YMNGTMSQV	369-377
		YMDGTMSQV	
	HLA-A24	AFLPWHRLF	206-214
	HLA-B44	SEIWRDIDF	192-200
	HLA-DR4	QNILLSNAPLGPQFP	56-70
		SYLQDSDPDSFQD	450-462
Pmel17 ^{gp100}	HLA-A2	KTWGQYWQV	154-162
	HLA-A2	AMLGHTTMEV	177-186
	HLA-A2	MLGHTTMEV	178-186
	HLA-A2	ITDQVPFSV	209-217
	HLA-2	YLEPGPVTA	280-288
	HLA-A2	LLDGTATLRL	457-466
	HLA-A2	VLYRYGSFSV	476-485
	HLA-A2	SLADTNSLAV	570-579
	HLA-A3	ALLAVGATK	17-25
Melan-A ^{MART-1}	HLA-A2	(E)AAGIGILTV	26(7)-35
	HLA-A2	ILTVILGVL	32-40
gp ^{75TRP-1}	HLA-A31	MSLQRQFLR	
TRP-2	HLA-A31	LLGPGRPYR	197-205

TABLEAU 6: Epitopes de tumeurs résultant de mutations

Gene/proteine	Tumeur	MHC Restriction	Peptide	Position des acides aminés
MUM-1	Mélanome	HLA-B44	EEKLIVVLF	30-38
CDK4	Mélanome	HLA-A2	ACDPHSGHFV	23-32
β -catenine	Mélanome	HLA-A24	SYLDSGIHF	29-37
HLA-A2	carcinome rénal	-	-	-
CASP-8	carcinome squameux de la tête et du cou	HLA-B35	FPSDSWCYF	476-484

TABLEAU 7**Antigènes communs à diverses tumeurs**

Gene	tissu où a lieu l'expression normale	MHC restriction	Peptide antigénique	Position des acides aminés
MAGE-1	testicules	HLA-A1	EADPTGHSY	161-169
		HLA-Cw16	SAYGEPRKL	230-238
MAGE-3	testicules	HLA-A1	EVDPIGHLY	168-176
		HLA-A2	FLWGPRALV	271-279
		HLA-B44	MEVDPIGHLY	167-176
BAGE	testicules	HLA-Cw16	AARAVFLAL	2-10
GAGE-1/2	testicules	HLA-Cw6	YRPRPRRY	9-16
RAGE-1	répine	HLA-B7	SPSSNRIRNT	11-20
GnTV	aucun	HLA-A2	VLPDVFIRC	38-64
mucine	seins lors de la lactation	pas de restriction	PDTRPAPGSTAPPA HGV TSA*	

* transcript aberrant de la N-acétyl glucosaminyl transferase V (GnTV) trouvé uniquement dans les mélanomes.

TABLEAU 8

LIPOPEPTIDES	RENDEMENT DE FILTRATION
NEF66	quantitatif
NEF117	80%
NEF182	quantitatif
GAG183	80%
GAG253	77%
ENV	quantitatif

TABLEAU 9

Peptide	Solvant	concentration (mg/mL)	Volume prélevé (mL)	Rendement de filtration(%) après mélange
NEF66	eau	5	1	95
NEF 117	AcOH 25%	5	1	81
NEF 182	AcOH 25%	5	1	92
GAG 183	AcOH 80%	10	0,5	73
GAG 253	AcOH 25%	5	1	31
ENV	eau	5	1	95

TABLEAU 10

Peptide	solvant	concentration (mg/ml)	volume prélevé (ml)	rendement de filtration (%) après mélange *
NEF 66	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
NEF 117	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
NEF 182	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
GAG 183	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
GAG 253	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif
ENV	AcOH 80%	20	0,250	quantitatif

* à la précision du dosage près.

TABLEAU 11

peptide	pesée exacte*** (mg)	peptide net	quantité attendue* (µg par dose)	quantité*** obtenue (µg par dose)	rendement ** (%)
NEF 66	764	641	550	505+/-15	89,14 -94,6
NEF117	739	641	550	621+/- 21	109,08 - 116,72
NEF182	742	641	550	545+/- 16	96,23 - 102,05
GAG183	741	642	550	478+/-13	84,50 - 89,23
GAG253	780	641	550	571+/- 28	98,76 - 108,95
ENV	810	642	550	593+/- 17	104,71 - 110,89

* la dose ciblée était de 500 µg par peptide; un surdosage de 10% a été délibérément prévu au moment de la pesée, compte tenu des rendements obtenus lors de la préparation du lot CK6.

5 **Les fourchettes des rendements reflètent la précision du dosage, et non une variation importante d'un flacon à l'autre.

*** Les valeurs en excès sont dues aux imprécisions des pesées de poudres électrostatiques par un opérateur revêtu du scaphandre standard.

TABLEAU 12
Essai uniformité de teneur

	nef 66	nef 117 total	nef 182	gag 183	gag 253	env 303
	14,40	17,74	16,19	13,28	16,74	17,53
	14,38	17,75	16,21	13,27	17,27	17,63
	14,67	16,36	16,61	13,41	16,89	18,36
échantillon 1	14,49	17,28	16,34	13,32	16,97	17,84
	13,42	17,11	15,32	12,66	15,56	16,36
	13,81	17,04	15,32	12,67	15,89	16,51
	13,77	17,06	15,33	12,45	15,16	16,41
échantillon 2	13,67	17,07	15,32	12,59	15,54	16,43
	13,58	17,08	15,33	12,68	15,64	16,29
	13,70	17,08	15,31	12,62	15,82	16,28
	13,59	17,05	15,31	12,32	14,85	16,37
échantillon 3	13,62	17,07	15,32	12,54	15,44	16,31
	13,20	16,80	15,14	12,23	16,05	16,15
	14,53	17,34	15,74	13,06	15,93	17,17
	13,49	16,86	15,17	12,31	15,44	16,15
échantillon 4	13,74	17,00	15,35	12,53	15,80	16,49
	13,88	17,21	15,40	12,52	14,78	16,80
	13,94	17,17	15,39	12,59	15,20	16,72
	13,98	17,19	15,47	12,96	15,49	16,71
échantillon 5	13,94	17,19	15,42	12,69	15,16	16,74
	14,03	17,26	15,75	11,62	15,78	16,97
	13,99	17,20	15,73	11,39	15,77	17,02
	14,20	17,26	15,74	12,19	15,90	16,80
échantillon 6	14,07	17,24	15,74	11,73	15,81	16,93
	13,78	17,29	15,67	12,69	16,13	18,04
	13,94	17,22	15,57	12,67	16,40	17,50
	13,95	17,23	15,55	12,28	16,19	17,37
échantillon 7	13,89	17,25	15,60	12,55	16,24	17,64
	13,84	17,06	15,38	12,50	15,62	17,90
	13,65	17,09	15,45	12,44	16,02	17,73
	13,73	16,94	15,37	nd	16,21	17,54
échantillon 8	13,74	17,03	15,40	12,47	15,95	17,73
	14,03	17,40	15,66	12,77	16,46	18,56
	14,07	17,33	15,72	11,92	16,61	18,41
	13,89	17,39	15,72	12,68	15,94	18,37
échantillon 9	14,00	17,37	15,70	12,46	16,34	18,45
	13,34	16,88	15,33	12,07	14,70	17,92
	13,71	17,24	15,66	12,36	15,12	18,50
	13,53	16,93	15,44	12,28	14,44	18,01

TABLEAU 12 (suite)
Essai uniformité de teneur

échantillon 10	13,53	17,02	15,48	12,24	14,76	18,14
	13,72	17,22	15,64	12,41	14,89	18,32
	13,75	17,33	15,72	12,36	14,82	18,31
	13,67	17,21	15,72	11,86	14,61	18,69
échantillon 11	13,71	17,25	15,69	12,21	14,77	18,44
	13,62	17,11	15,60	12,28	14,75	18,42
	13,74	17,13	15,70	12,44	14,98	18,31
	13,75	17,16	15,63	12,51	15,37	18,32
échantillon 12	13,70	17,13	15,65	12,41	15,03	18,35
	13,32	16,36	14,74	12,47	16,17	15,44
	13,31	16,41	14,68	12,51	16,26	15,56
	13,34	16,38	14,67	12,53	16,17	15,43
échantillon 13	13,32	16,38	14,70	12,50	16,20	15,48
	13,76	16,72	14,75	12,67	16,10	15,59
	13,56	16,35	14,75	12,64	16,16	15,64
	13,60	16,67	14,76	12,64	16,06	15,64
échantillon 14	13,64	16,58	14,76	12,65	16,10	15,62
	13,36	16,40	14,53	12,48	15,90	15,64
	13,41	16,35	14,57	12,52	15,84	15,80
	13,44	16,43	14,50	12,46	15,77	15,60
échantillon 15	13,40	16,39	14,53	12,49	15,84	15,68
m	13,69	16,91	15,28	12,49	15,81	16,82
écart type	0,27	0,37	0,42	0,28	0,59	1,19
t*s	0,58	0,79	0,89	0,59	1,24	2,51
min	13,11	16,12	14,39	11,91	14,57	14,30
max	14,27	17,70	16,18	13,08	17,05	19,33
t = 2,110	3 valeurs abhérantes sur échantillon 1 (erreur de dilution probable)					
essai uniformité de teneur						
min accepté (-15%)	11,64	14,37	12,99	10,62	13,44	14,29
max accepté (+15%)	15,74	19,45	17,58	14,37	18,18	19,34
écart observé	4,23%	4,67%	5,84%	4,70%	7,84%	14,95%

TABLEAU 13

Lignées CTL anti-7 peptides	Peptides reconnus	Petits peptides reconnus
92102	GAG 2466281	
92105	NEF 125-147	
92109	NEF 101-126 NEF 125-147 NEF 155-178 NEF 201-225 GAG 246-281	NEF 101-110 NEF 116-126 NEF 128-136 NEF 169-178 NEF 215-225
92120	GAG 246-281	
92125	NEF 155-178	NEF 169-178
92129	NEF 125-147 NEF 155-178 NEF 201-225	NEF 128-136 NEF 169-178 NEF 201-211 NEF 211-219
92117	négative	
92127	NEF 101-126 NEF 125-147 NEF 155-178	

REVENDECATIONS

1. Micelles mixtes ou micro-agrégats pour l'induction d'une réponse immunitaire contenant au moins:

- un premier lipopeptide comprenant au moins un épitope CTL et au moins un motif lipidique, et
- un second lipopeptide comprenant au moins un épitope T auxiliaire et au moins un motif lipidique, dont la nature peut être différente du motif du premier lipopeptide.

2. Micelles ou micro-agrégats selon la revendication 1, caractérisés en ce que les lipopeptides comprennent indépendamment un ou plusieurs motifs lipidiques en C₄ à C₁₈.

3. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisés en ce que les lipopeptides comprennent indépendamment une ou deux chaînes lipidiques en C₄ à C₁₈ associées par liaison covalente à un ou deux acides aminés de la partie peptidique.

4. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que les motifs lipidiques des lipopeptides sont constitués de deux chaînes d'acide palmitique liées aux groupements NH₂ d'une lysine.

5. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que les motifs lipidiques des lipopeptides comprennent indépendamment un résidu d'acide palmitique, d'acide 2-amino hexadécanoïque, d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide linolénique de pimélaute, de trimélaute ou un dérivé du cholestérol.

6. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que la partie non lipidique des lipopeptides, comprenant les épitopes, comprend entre 10 et 100, et préférentiellement entre 10 et 50 acides aminés.

7. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est un épitope multivalent.

8. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est le peptide 83O-843 de la toxine tétanique présentant la séquence suivante:

5 **QYIKANSKFIGITE**

9. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que l'épitope T auxiliaire est l'épitope de l'hémagglutinine ou l'épitope PADRE.

10 10. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisés en ce que les lipopeptides contiennent au moins un épitope CTL d'une protéine spécifique du mélanome, d'une protéine du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la protéine p-53, ou d'une protéine spécifique de *Plasmodium falciparum*.

15 11. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisés en ce qu'ils comprennent les lipopeptides suivants:

GAG 17 EKIRLRPGGKKKYKLKHIV K(Pam)-NH₂
GAG 253 NPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD K(Pam)-NH₂
POL 325 AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDL K(Pam)-NH₂
 20 **NEF 66 VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL K(Pam)-NH₂**
NEF 116 HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Pam)-NH₂
TT Ac-QYIKANSKFIGITELKK K(Pam)-NH₂

25 12. Micelles ou micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisés en ce qu'ils comprennent les lipopeptides suivants:

LSAE CT1 LLSNIEEPKENIIDNLLNNIK(Pam)-NH₂
LSA3 NRI Ac-DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQK(Pam)-NH₂
LSA3 NRII Ac-LEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNVK(Pam)-NH₂

LSA3 RE K(Pam)VESVAPSVVEESVAPSVVEESVAENVEESVAENV-NH₂

13. Utilisation de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin
5 pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique.

14. Utilisation de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 pour la fabrication d'un médicament ou d'un vaccin pour l'induction d'une réponse immunitaire à l'encontre du VIH, du VHB, du papillomavirus, de la p53, du mélanome ou de la malaria induite par
10 *Plasmodium falciparum*.

15. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une dose pharmacologiquement efficace de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12 et des excipients pharmaceutiquement compatibles.

16. Médicament ou vaccin, caractérisé en ce qu'il contient des micelles ou des micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12.

17. Procédé de fabrication de micelles ou de micro-agrégats selon l'une des revendications 1 à 12, comprenant les étapes suivantes:

- dispersion de chacun des lipopeptides les constituant dans une
20 solution d'acide acétique concentrée à environ 80% puis
- mélange des solutions ainsi obtenues

18. Procédé selon la revendication 17 caractérisé en ce que l'obtention d'une dispersion des lipopeptides mis en solution dans l'acide acétique est vérifiée par la méthode de résonance magnétique nucléaire en
25 deux dimensions.



Le Mandataire
Cabinet HARLÉ & PHÉLIP

ORIGINAL

1/9

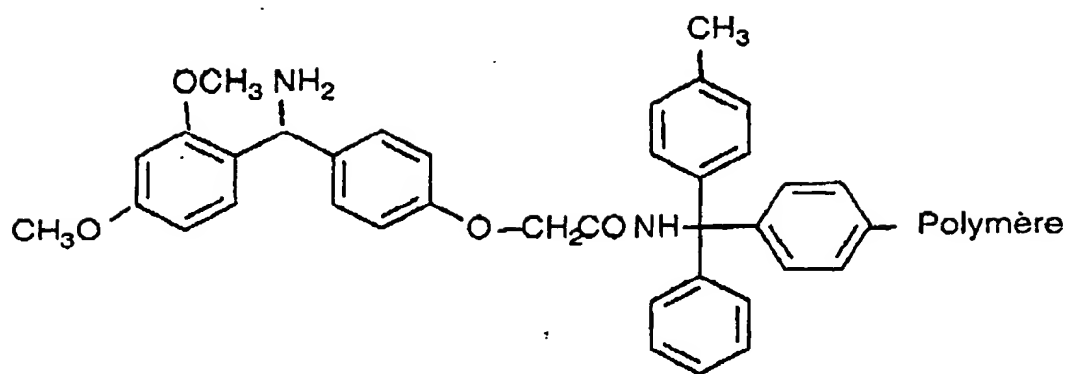


FIGURE 1

ORIGINAL

2/9

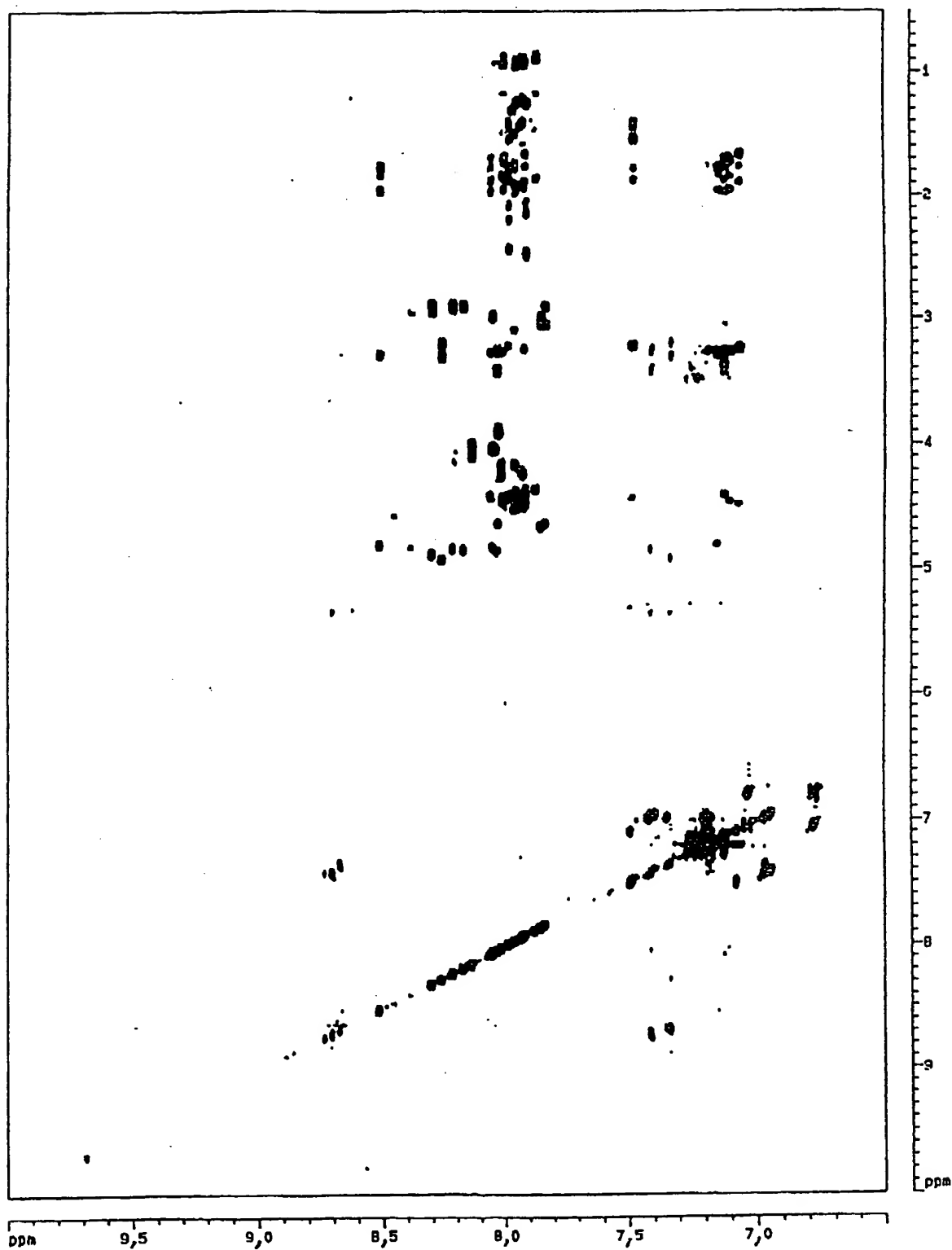


FIGURE 2

ORIGINAL

3/9

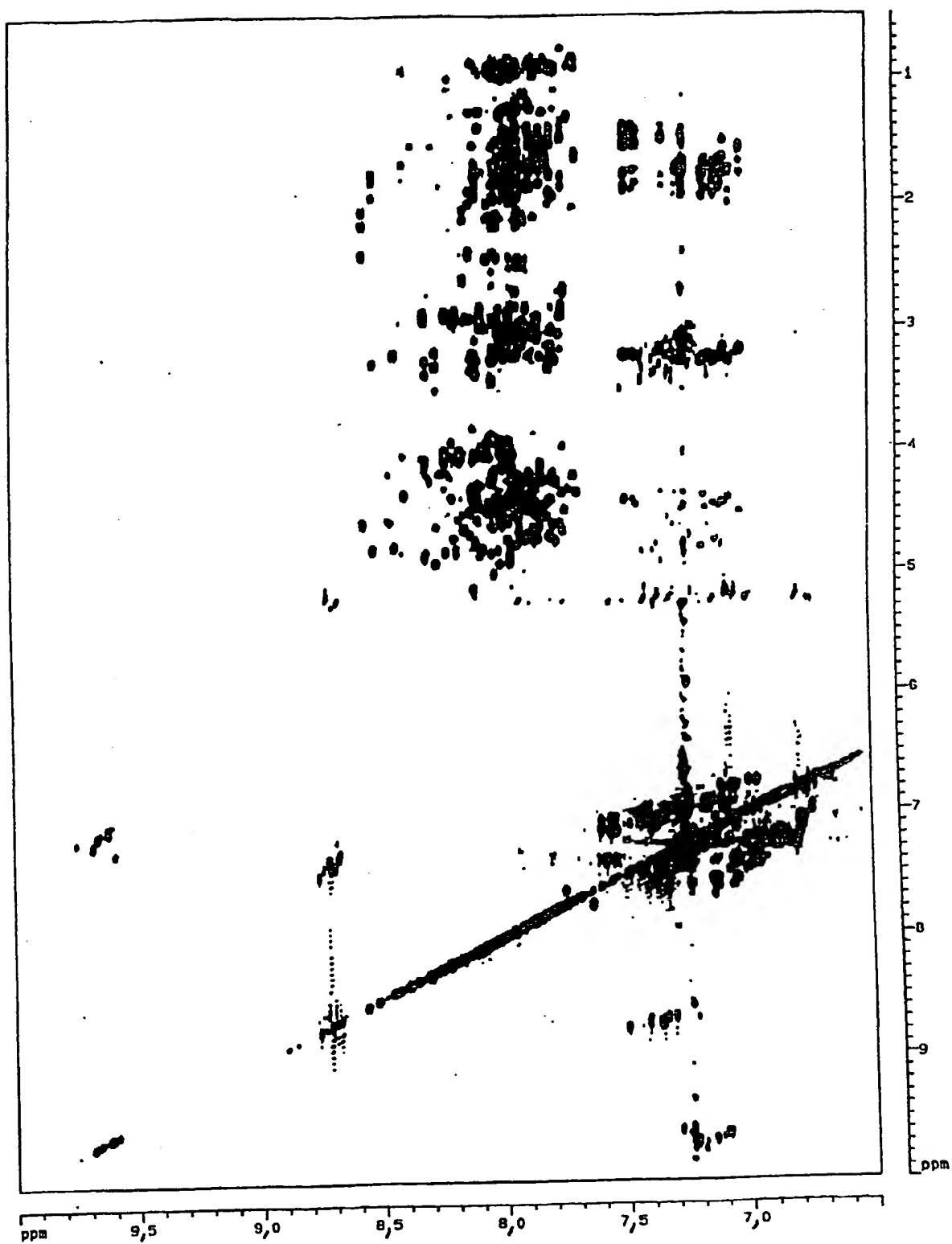


FIGURE 3

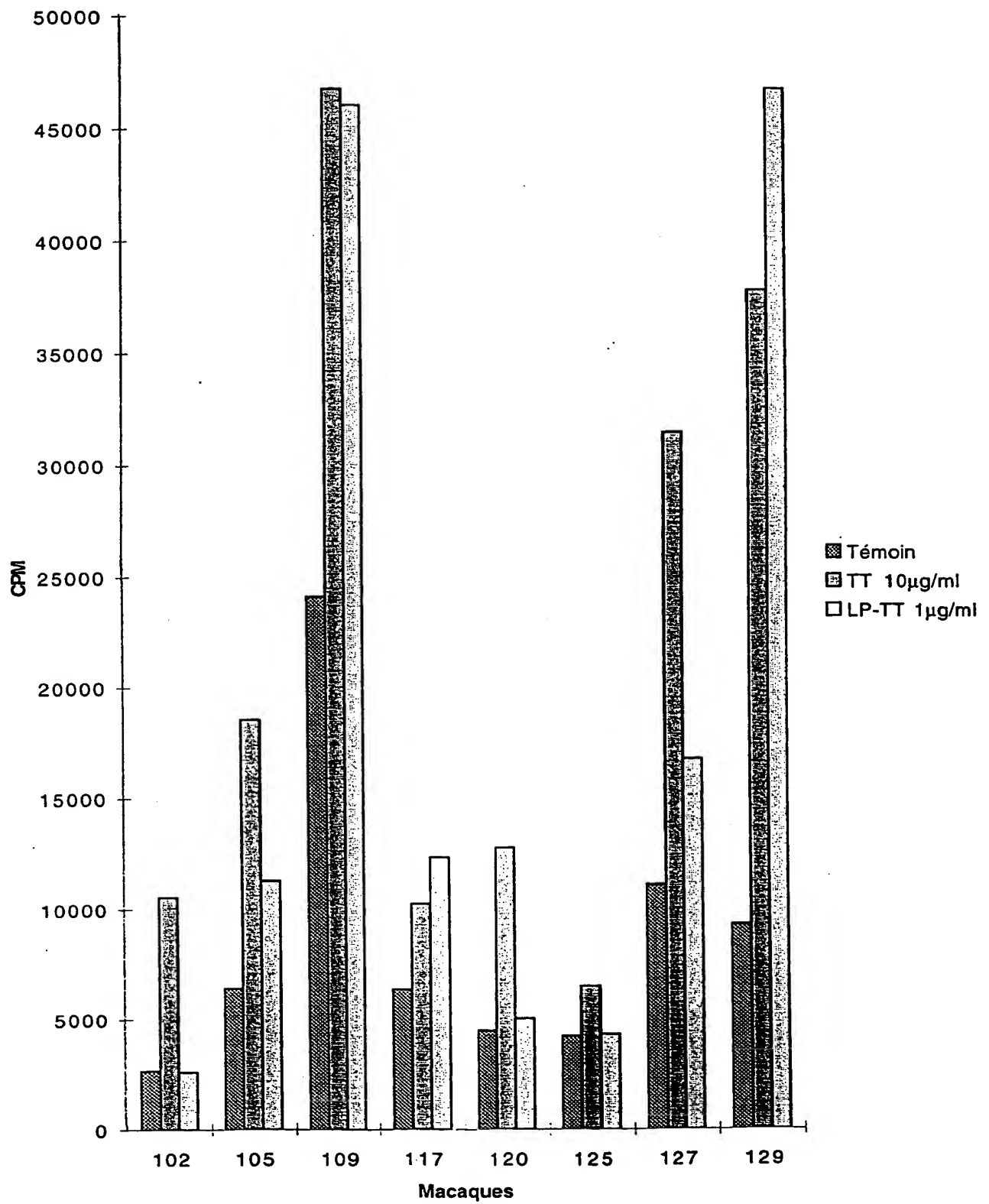


FIGURE 4

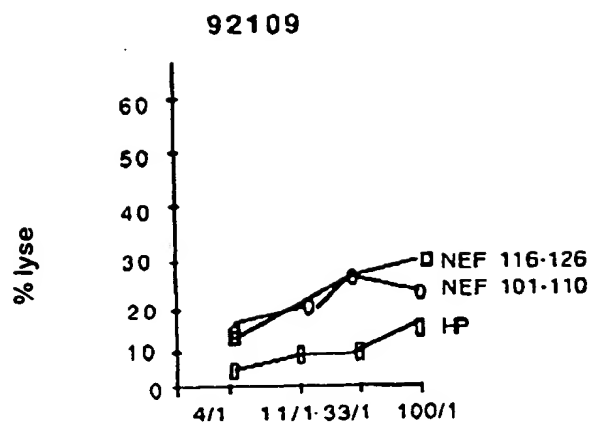


FIGURE 5A

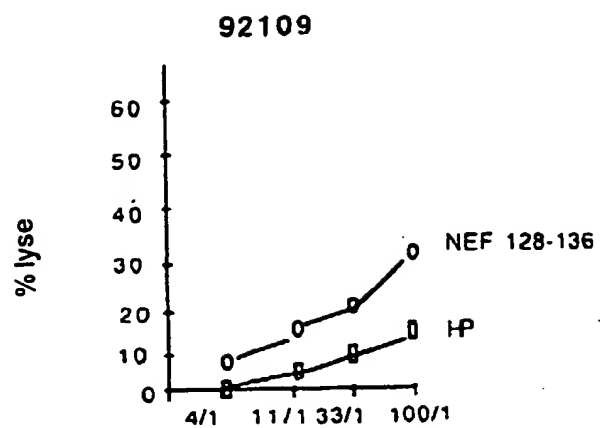


FIGURE 5B

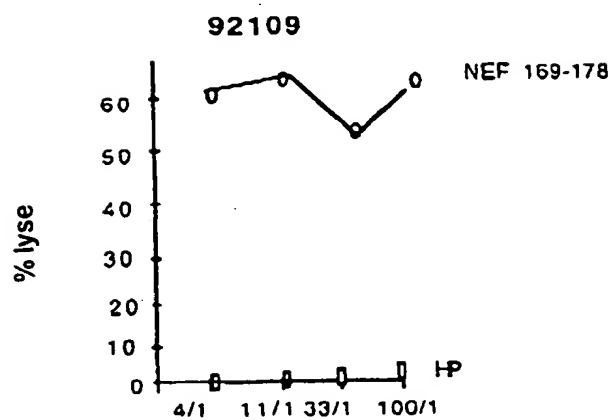


FIGURE 5C

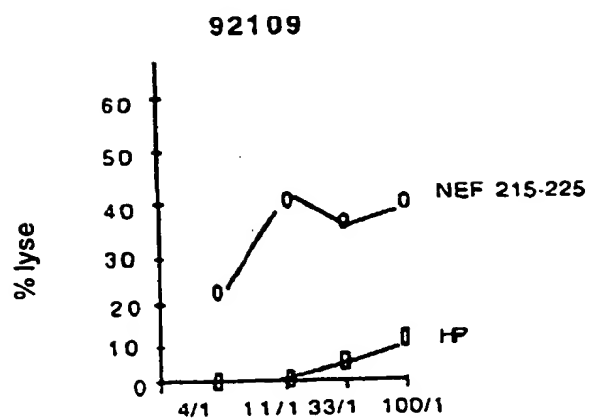


FIGURE 5D

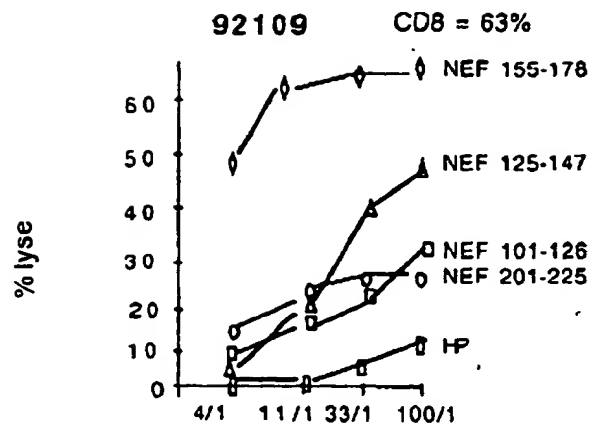


FIGURE 5E

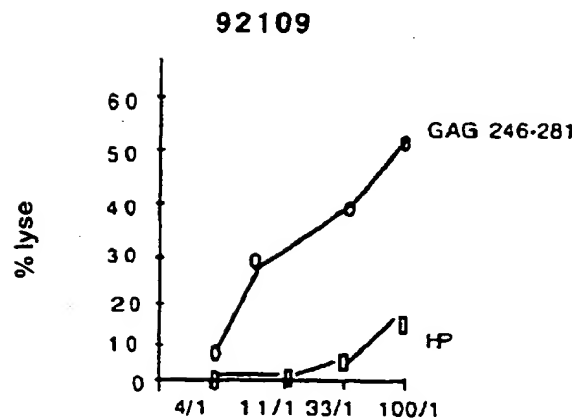


FIGURE 5F

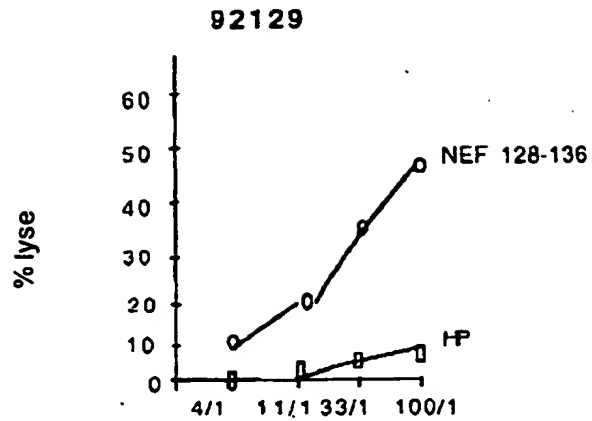


FIGURE 6A

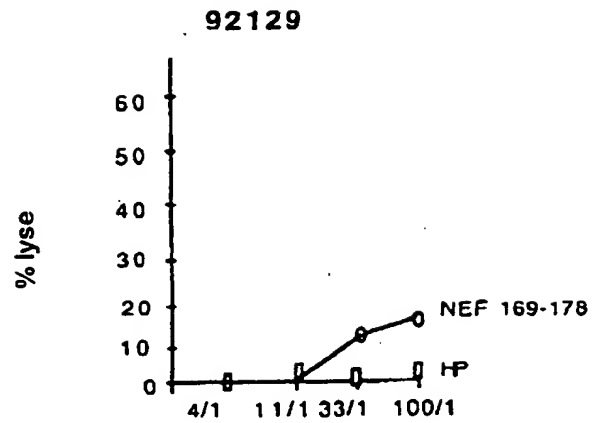


FIGURE 6B

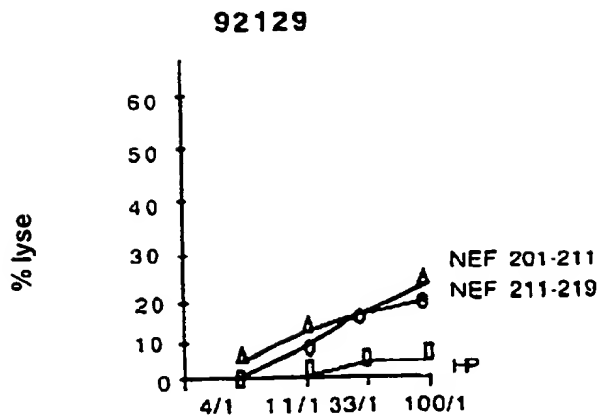


FIGURE 6C

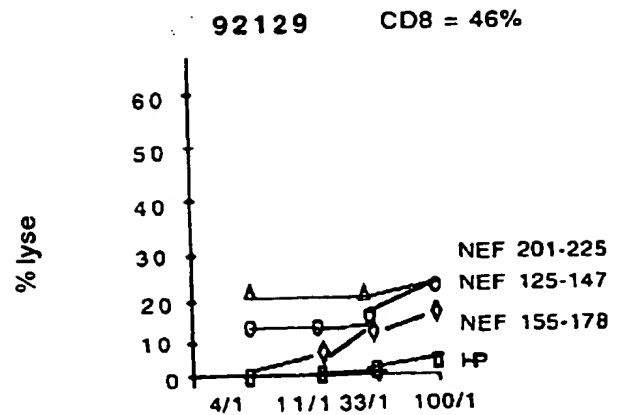


FIGURE 6D

ORIGINAL

8/9

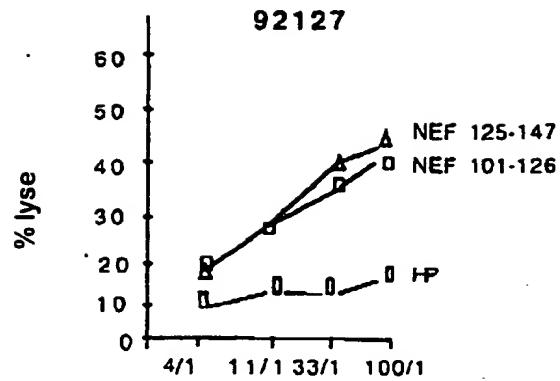


FIGURE 7A

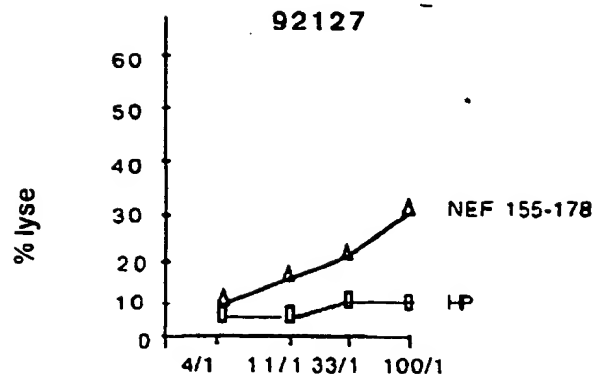


FIGURE 7B

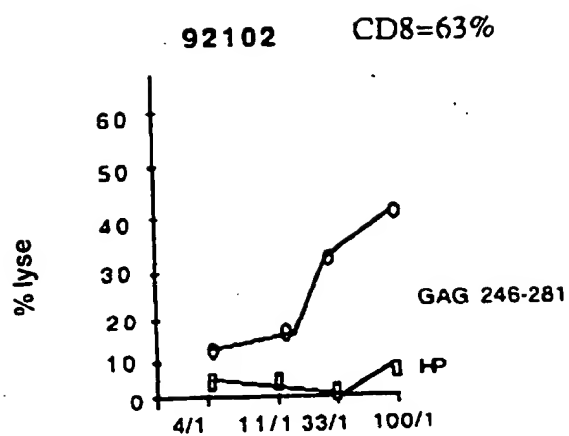


FIGURE 8

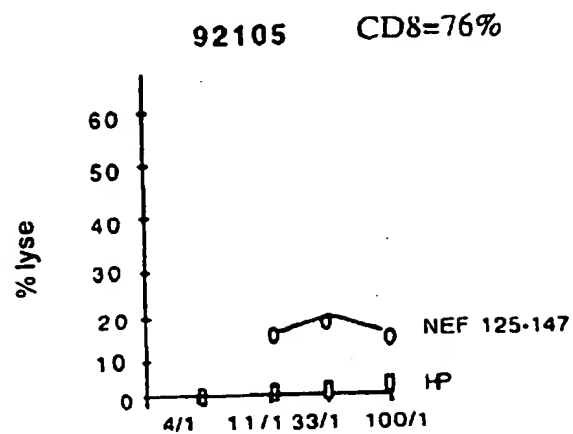


FIGURE 9

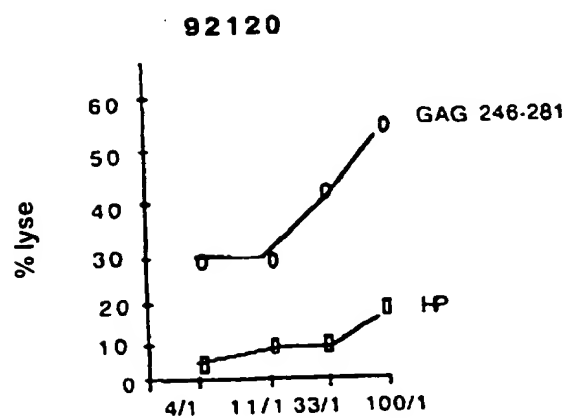


FIGURE 10

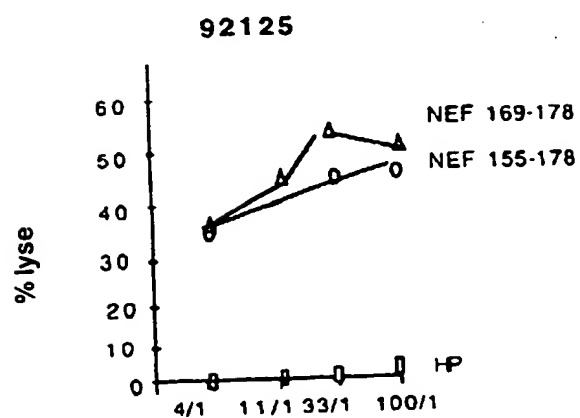


FIGURE 11

THIS PAGE BLANK (USPTO)